

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 Patentgesetz

# PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **235 775 A3**

4(51) **A 61 K 39/255**  
**C 12 N 7/02**

**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	WP A 61 K / 176 027 3	(22)	25.01.74	(45)	21.05.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

---

(71)	VEB „Friedrich-Loeffler-Institut“, Insel Riems, DD
(72)	Hahnefeld, Horst, Dr. med.; Solisch, Peter, Dr. med.; Liebermann, Heinrich, Prof. Dr. med. vet. habil., DD
(73)	siehe (72)
(74)	Wolfgang, Bergemann, 2200 Greifswald, Rosenweg 1, DD

---

(54)	Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Mareksche Krankheit der Hühner
------	--

---

ISSN 0433-6461

2 Seiten

## Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Mareksche Krankheit, **dadurch gekennzeichnet**, daß man von Entenembryozellkulturen, die mit Putenherpesvirus in hoher Dosierung beimpft werden, lediglich die Zellphase verwendet, während man die Kulturflüssigkeit abtrennt, die Zellen nach Ausbildung eines maximalen zytopathischen Effektes aber noch vor Auftreten von Zerfallserscheinungen in hohen Konzentrationen in einem serumhaltigen Medium ohne besondere Schutzmaßnahmen einfriert und anschließend lyophilisiert.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Putenherpesvirus-Gewebekulturvakzine gegen die Mareksche Krankheit der Hühner.

Zur Herstellung wirksamer Gewebekulturimpfstoffe gegen die Mareksche Krankheit sind verschiedene Verfahren bekannt. Bei einem Teil der Verfahren wird das Virus der Marekschen Krankheit über embryonale Hühnernierenzellkulturpassagen attenuiert und als zellassoziertes Virus in einer Suspension lebender Zellen zur Vakzinherstellung verwendet. Auch mit natürlicherweise vorkommenden, für Hühner nicht pathogenen Virusstämmen werden über Hühner- oder Entenembryozellkulturen Impfstoffe gegen die Mareksche Krankheit hergestellt.

Bei den anderen Verfahren bildet das dem Marekvirus verwandte, für Hühner apathogene Herpesvirus der Puten nach Züchtung in Enten- oder Hühnerembryozellkulturen die Grundlage für eine Virusproduktion. Bei diesem Virus ist die Spezieszugehörigkeit der Wirtszellen ausschlaggebend für die Art der damit hergestellten Vakzinen. Da das in Entenembryozellkulturen produzierte Putenherpesvirus streng zellassoziert bleibt und nicht in die Kulturflüssigkeit freigesetzt wird, stellen die auf Entenzellbasis hergestellten Impfstoffe eine Suspension lebender, virushaltiger Zellen dar. Im Vergleich hierzu findet sich das in Hühnerembryozellkulturen gezüchtete Putenherpesvirus sowohl in den Zellen als auch frei im Kulturmedium. Die virushaltige Kulturflüssigkeit bildet hier das Ausgangsmaterial für die Produktion zellfreier Vakzinen, die durch Lyophilisation konserviert und bei Kühlschranktemperatur gelagert und transportiert werden können. Zellfreie Putenherpesvakzinen werden aus virushaltigen Hühnerembryozellkulturen auch dadurch hergestellt, daß man die Zellen durch Ultraschallbehandlung zerstört, den Zelldetritus durch Zentrifugation entfernt und das freigesetzte Virus als Ausgangsmaterial für lyophilisierte Vakzine verwendet.

Die lebende Zellen enthaltenden Marekvirus- und Putenherpesvirus-Vakzinen haben den Nachteil, daß besondere Aufwendungen zur Erhaltung der Zellaktivität erforderlich sind. Diese werden vornehmlich durch die Konservierung bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff und durch den Versand bei  $-75^{\circ}\text{C}$  in  $\text{CO}_2$ -Trockeneis verursacht. Nachteilig wirkt sich ferner aus, daß die für eine Vakzinevorratshaltung bei tiefen Temperaturen notwendigen technischen Einrichtungen nur wenigen Geflügelproduktionsbetrieben zur Verfügung stehen. Die Einsatzfähigkeit der zellhaltigen Vakzinen und ihre Exportmöglichkeiten werden hierdurch eingeschränkt. Andererseits ergeben sich auch Nachteile bei der Herstellung zellfreier Vakzinen aus Hühnerembryozellkulturen. Sie beruhen darauf, daß sich in den Kulturen verschiedene für Hühner pathogene Viren anreichern können, die aus latent infizierten Embryonen stammen. Entenembryonen enthalten derartige Viren nicht oder nur in seltenen Ausnahmefällen. Es sind daher kostenaufwendige Maßnahmen erforderlich, um in den Eierlieferbetrieben die Erhaltung eines von spezifischen Krankheitserregern freien Status der Legehennen zu gewährleisten.

Es ist der Zweck der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Mareksche Krankheit anzubieten, bei dem die Nachteile der bekannten Verfahren vermieden werden, ein Freisein von latenten für Hühner pathogenen Virus gewährleistet ist, der unter einfachen Bedingungen konserviert werden kann, einen hohen Grad an aktivem Virus und immunogenen Bestandteilen der infizierten Zellen, Membranantigene, sowie einen hohen protektiven Effekt aufweist und in industriellem Maßstab produzierbar ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das in Entenembryozellkulturen frei von Verunreinigungen durch latente Viren gezüchtete Putenherpesvirus in einen Zustand zu überführen, in dem es bei Kühlschranktemperaturen lagerfähig ist. Die Konzentration an aktivem Virus soll hierbei in einer für die Impfstoffherstellung geeigneten Größenordnung erhalten bleiben. Erfindungsgemäß geht man bei der Vakzineherstellung von der zellulären Phase mit Putenherpesvirus beimpfter Entenembryozellkulturen aus, wozu man vorzugsweise Rollkulturen verwendet. Die flüssige Phase wird verworfen. Die Zellen mit dem darin enthaltenen Virus werden bei Auftreten eines maximalen zytopathischen Effektes aber noch vor Einsetzen von Zellzerfallserscheinungen durch Trypsinbehandlung von der Wand der Kulturgefäße abgelöst, durch Zentrifugieren sedimentiert, in hohen Konzentrationen in einem geeigneten Medium resuspendiert, bei vorzugsweise  $-40^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend ohne Zusatz von Stabilisatoren lyophilisiert.

Das lyophilisierte Kulturmaterial stellt eine homogene Trockenmasse dar, die aktives Putenherpesvirus zum Teil umschlossen von Zellmembranen in einer Konzentration von  $10^3$ – $10^4$  plaquebildenden Einheiten pro 0,2 ml sowie reichlich Zellmaterial enthält, die in wässrigen Flüssigkeiten leicht suspendiert und die in einfachen Kühleinrichtungen vorzugsweise bis zu  $6^{\circ}\text{C}$  für mindestens 3 Monate ohne Titerverlust gelagert werden kann.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

## Beispiel:

Als Ausgangsvirus für die Vakzineherstellung verwendet man zellassoziertes Putenherpesvirus, das man von Entenembryozellkulturen in Rollflaschen mit maximalem zytopathischen Effekt durch Trypsinbehandlung gewinnt. Das Virus wird in einem Medium suspendiert, das Bachrach-Medium und Melnick's-Laktalbuminhydrolysat-Medium im Verhältnis 1:2 sowie 5% Serum vom Rind enthält. Bei dieser Virussuspension werden die zur Impfstoffherstellung vorgesehenen 3–6 Tage alten Entenembryozellkulturen in Rollflaschen beimpft. Das Verhältnis der Zahl der Virusausgangskulturen zur Zahl der beimpften Kulturen beträgt dabei 1:16. Das gleiche Medium ohne Virus dient als Erhaltungsmedium für unbeimpfte Zellkontrollkulturen. Nach 2–3tägiger Bebrütung bei  $38^{\circ}\text{C}$ , wenn die beimpften Kulturen einen maximalen zytopathischen Effekt zeigen, dekantiert man das Medium. Die Zellen suspendiert man durch Behandlung mit Trypsin, sedimentiert sie durch 3 Minuten langes Zentrifugieren bei 1000 U/min, wonach man die Zellsedimente im Verhältnis 1:2 mit Bachrach-Medium mit 10% Rinderserum wieder aufschwemmt. Die Virussuspension füllt man auf Glasampullen ab, friert sie bei  $-40^{\circ}\text{C}$  ein und lyophilisiert

Patent claim:

Process for the manufacture of a vaccine against Marek disease, characterized by one dal3 Duck embryo cell cultures, with turkey herpesvirus in high doses are inoculated, only the cell phase, while the culture fluid separated the cells after formation of a maximum cytopathic effect, but before Incidence of decay phenomena in high concentrations in a particular medium without serum Safeguards freezes, and then lyophilized.

The present invention relates to a method for producing a lyophilized turkey herpes virus tissue culture vaccine against the Marek disease of chickens.

To produce effective tissue culture vaccines against Marek disease are different methods known. In one part of the process is the virus of Marek disease on chicken embryonic kidney cell culture passages and as cell-associated attenuated virus in a suspension of living cells to Vaccine production used. Even with naturally occurring, non-pathogenic for chickens are virus strains on chicken or Duck embryo cell cultures Marek vaccines against the disease produced.

The other is the method the Marek virus related for chicken apathogene Herpesvirus of turkey after breeding in

duck or chicken embryo cell cultures to Basis for a virus production. This virus is the species belonging the host cells is crucial for the nature of the manufactured vaccines. Since the duck embryo cell cultures produced Turkey herpesvirus cell-associated remains strictly and not in the culture fluid is released, the ducks on cellular base produced a Suspension of live virus-containing cells dar. By comparison can be found in Chicken embryo cell cultures bred turkey herpes virus in the cells and released in the culture medium. The virus Liquid culture here is the raw material for the production of cell-free vaccines, through the lyophilization conserved refrigerated and stored and can be transported. Free Cell Turkey herpes vaccines from virus chicken embryo cell cultures also produced, that the cells destroyed by ultrasound treatment, the Cell detritus removed by centrifugation and the released virus as starting material for lyophilized vaccine used.

The living cells containing Marek virus and turkey herpes virus vaccines have the disadvantage dal3 special Expenses for the conservation the cell activity necessary. These are mainly due to the preservation of  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen, and by sending at  $-75^{\circ}\text{C}$  in CO<sub>2</sub> dry ice caused. The disadvantage is also from the dal3 for a

vaccine stockpile in case of low temperatures necessary technical facilities only a few Poultry production facilities available. The use of the vaccines and their cell containing

Export opportunities are therefore limited. However there are also disadvantages in the manufacture cell-free

Vaccines from chicken embryo cell cultures. They stem from the fact that in the different cultures of chicken pathogenic viruses can enrich the latently infected from embryos. Duck embryos contain such viruses are not or only in very exceptional cases. It is therefore costly measures are necessary in order to supply eggs to farms

Conservation of a specific pathogen-free status of laying hens to ensure.

It is the purpose of the invention, a method for producing a vaccine against the disease Marek offer at the disadvantages of known procedures to be avoided, an absence of latent virus pathogenic for chickens is guaranteed, under simple conditions can be preserved, a high degree of active virus and

immunogenic components of the infected cells, membrane antigens, and a high protective effect of substance and in industrial scale is produced.

The invention is based on the task, which Duck embryo cell cultures free from contamination by latent viruses Herpesvirus of turkey farmed in a state to lead, which at refrigerator temperatures is stored. The Concentration of active virus is here in a suitable vaccine production scale preserved. According to invention, it is at of vaccine production of the cellular phase with turkey herpes virus inoculated Duck embryo cell cultures from what you preferably roll cultures used. The liquid phase is discarded. The cells with the virus will be contained in the presence of a maximum cytopathic effect but before the onset of Cell disintegration appearances by Trypsin treatment from the wall of culture vessels removed by centrifuging sedimented, in high concentrations in a suitable medium resuspended, preferably at  $-40^{\circ}\text{C}$  and frozen then, without addition of stabilizers lyophilized.

The lyophilized material culture is a homogeneous dry weight, which active turkey herpesvirus partly enclosed of cell in a concentration of  $10^3$ - $10^4$  plaque-forming units per 0.2 ml, and plenty of cell material contains, in aqueous liquids and easily suspended in simple refrigeration preferably up to 6 degrees C for at least 3 months without Titer loss can be stored.

The invention aims at a below example in more detail.

Example:

As the starting virus for vaccine production, use cell-associated turkey herpes virus, one of the Ducks embryo cell cultures in rolling bottles with maximum cytopathic effect Trypsin treatment wins. The virus is suspended in a medium, the medium-Bachrach and Melnick-Laktalbuminhydrolysat media at a ratio of 1: 2 and 5% bovine serum contains. With this suspension, the virus for vaccine production provided 3-6 days old duck embryo cell cultures in roller bottles inoculated. The ratio the number of virus cultures, starting with the number of inoculated cultures amounts to 1: 16 The same medium without virus serves as a preservation medium for uninoculated Control cell cultures. After 2-3 days of incubation at 38 °C when the cultures inoculated a maximum cytopathic effect show Decant the media. The suspended cells obtained by treatment with trypsin, sedimented it by 3 Long Centrifuge minutes at 1000 U/min, that the sediments in the cell ratio of 1: 2 with Bachrach medium containing 10% Bovine serum again aufschwemmt. The virus suspension is filled glass vials that it freezes at -40 °C and lyophilized

DERWENT-ACC-NO: 1986-245830

DERWENT-WEEK: 198638

COPYRIGHT 2008 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prod'n. of marek's disease vaccines by freeze drying duck  
embryo cells infected with turkey herpes virus

PATENT-ASSIGNEE: LOEFFLER-INST[LOEFN]

PRIORITY-DATA: 1974DD-176027 (January 25, 1974)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
DD <u>235775</u> A	May 21, 1986	DE

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
DD 235775A	N/A	1974DD-176027	January 25, 1974

INT-CL-CURRENT:

TYPE	IPC	DATE
CIPS	A61K39/255	20060101
CIPS	C12N7/02	20060101

ABSTRACTED-PUB-NO: DD 235775 A

BASIC-ABSTRACT:

Prod'n. of vaccines against Marek's disease is effected by inoculating duck embryo cell cultures with turkey herpes virus at high dosage, separating the cells from the culture liq., freezing the cells at high concn. in a serum-contg. medium after the maximum cytopathic effect has been attained, but before any degeneration of the cells, and freeze drying the prod..

ADVANTAGE - The vaccines can be stored under simple conditions, have a high level of immunogenicity and can be produced on a large scale.

TITLE-TERMS: PRODUCE MAREK'S DISEASE VACCINE FREEZE DRY DUCK EMBRYO  
CELL INFECT  
TURKEY HERPES VIRUS

DERWENT-CLASS: B04 C03 D16

CPI-CODES: B02-V02; C02-V02; D05-H07;



CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M421 M720 N136 N513 Q233 V279

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: 1986-105762